

明 細 書

糖脂質の分離方法

技術分野

本発明は、試料溶液からの糖脂質の分離方法に関する。

背景技術

細胞の分化やガン化などに伴って細胞膜や細胞内に存在している糖脂質の糖鎖構造に変化が見られるという事実は、糖脂質が細胞の分化や増殖などに重要な役割を果たしていることを示唆しており、糖脂質の生物学的機能について盛んに研究が行なわれている。糖脂質の生物学的機能を解明するためには、精製された糖脂質を取得することが必要となるが、糖鎖を化学合成するのは容易なことではない。したがって、生体サンプルから糖脂質を分離することが必要となる。

また、糖脂質の分解酵素の遺伝性欠損は、糖脂質蓄積病の原因となる。例えば、糖脂質の一つであるガングリオシドの糖側鎖分解に関与するリソソーム酵素の遺伝性によってガングリオシドが脳その他の組織に蓄積する、GM2 ガングリオシド蓄積症（ガングリオシドーシス）などが知られている。ヒトなどの哺乳動物においては、これまでにGA2 およびGM2 蓄積症が確認されており、GM2 は欠損酵素により、サンドホフ病、テイ・サックス病、AB型GM2－ガングリオシドーシスに分類される。なお、GM1、GM2などはSvennerholmの命名法に基づく呼び名であり、シアル酸の個数が1，2，3，4，5個の分子をそれぞれGM，GD，GT，GQ，GPと呼び、基本糖鎖がGg₄Cer，Gg₃Cer，LacCer，GalCerであるものに

は 1, 2, 3, 4 を付ける。このような糖脂質蓄積病の診断、病態解明などにも、生体サンプルから糖脂質を分離することが必要となる。

生体サンプルからの糖脂質の分離方法としては、例えば、組織や細胞などから総脂質を抽出した後、総脂質から単純脂肪およびリン脂質を除いて糖脂質を分離する方法が一般的に用いられる。そして、総脂質から単純脂肪およびリン脂質を除いて糖脂質を分離するために、二相分配法、クロマトグラフィー法（例えば、DEAE-Sephadex などの陰イオン交換クロマトグラフィー、これとシリカゲルクロマトグラフィーとの組み合わせ）、弱アルカリ分解法などが用いられる。

二相分配法としては、フォルチ分配法や、その変法であるブライ・ダイアー抽出法がよく用いられる。フォルチ分配法では、クロロホルム-メタノール（2 : 1 (v / v)）による脂質抽出液に 1 / 5 倍容の水または 0.75 ~ 0.9 % KCl 水溶液を加えて攪拌すると、水-メタノール上層とクロロホルム下層とに分離する。上層には水溶性のガングリオシドが抽出され、下層にはそれ以外の総脂質が抽出される。しかしながら、糖鎖の短いガングリオシド（GM4 や GM3 など）は下層に分配される傾向にあるため、現在は二相分配法よりもクロマトグラフィー法が繁用されている。また、弱アルカリ分解法によってリン脂質を除いた場合には、透析などによる脱塩操作が必要となる。

発明の開示

上述したように、総脂質から単純脂肪およびリン脂質を除いて糖脂質を分離する方法として種々の方法が開発されているが、それぞれの方法は、糖脂質の回収率や精製度（純度）、要する手間やコストの面から一長一短である。例えば、クロマトグラフィー法ではサンプルの前処理に手間がかかるとともに、コストがかかるため多数のサンプル処

理には適しない。また、弱アルカリ分解法では、透析による脱塩によって、糖脂質の回収率が低下すると考えられている。

そこで、本発明は、簡便かつ低コストに多数のサンプルを処理でき、しかも多種類の糖脂質を回収できるとともにその回収率が高い、糖脂質（特にガングリオシド）の分離方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明は、下記（１）～（６）の糖脂質の分離方法およびガングリオシドの分離方法を提供する。

（１）以下の工程：

（a）生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出した抽出物に加水分解処理を施して得られる試料溶液を、該試料溶液よりも浸透圧の低い溶液に半透膜を介して接触させる工程

（b）前記接触を、前記試料溶液が二層または三層に分かれるまで継続し、中間層および／または下層を分離する工程を含むことを特徴とする糖脂質の分離方法。

（２）前記糖脂質がガングリオシドであって、前記工程（b）において、前記接触を前記試料溶液が三層に分かれるまで継続し、中間層を分離することを特徴とする前記（１）記載の分離方法。

（３）生体サンプルが、動物若しくは植物の細胞若しくは組織または微生物の菌体であることを特徴とする前記（１）または（２）記載の分離方法。

（４）前記非極性溶媒がクロロホルム、ピリジンまたはこれらの混合物であり、前記極性溶媒が水、メタノール、酢酸ナトリウムまたはこれらの２種以上の混合物であることを特徴とする前記（１）～（３）のいずれかに記載の分離方法。

（５）前記非極性溶媒と極性溶媒との混合液が、水とメタノールとクロロホルムとピリジンとの混合物であることを特徴とする前記（１）

～（３）のいずれかに記載の分離方法。

（６）前記試料溶液が、前記抽出物に加水分解処理を施した後、中和処理を施して得られるものであることを特徴とする前記（１）～（５）のいずれかに記載の分離方法。

図面の簡単な説明

図１は、本発明に係る糖脂質の分離方法によって得られた上層、中間層および下層を薄層クロマトグラフィー処理したときの展開結果を示す図である。

図２は、本発明に係る糖脂質の分離方法および従来法で得られた糖脂質を薄層クロマトグラフィー処理したときの展開結果を示す図である。

図３は、本発明に係る糖脂質の分離方法によって様々な組織から得られた糖脂質を薄層クロマトグラフィー処理したときの展開結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の糖脂質の分離方法は、以下の工程：

（ａ）生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出した抽出物に加水分解処理を施して得られる試料溶液を、該試料溶液よりも浸透圧の低い溶液に半透膜を介して接触させる工程

（ｂ）前記接触を、前記試料溶液が二層または三層に分かれるまで継続し、中間層および／または下層を分離する工程を含むことを特徴とする。

「糖脂質」は、分子内に水溶性糖鎖と脂溶性基の両者を含む物質の

総称であり、脂溶性基によってスフィンゴ糖脂質とグリセロ糖脂質とに大別されるが、この他にステロイド、ヒドロキシ脂肪酸等の脂溶性基をもつグリコシド（例えば、ステリルグリコシド、ステロイド配糖体、ラムノリピド等）も広い意味での糖脂質に含まれる。また、シアル酸、ウロン酸、硫酸、リン酸等をもつ糖脂質（例えば、ガングリオシド、スルファチド、スルホリピド等）は酸性糖脂質と呼ばれ、中性糖脂質と区別される。本発明において分離対象となる糖脂質は、これらのうち、何れの種類の糖脂質であってもよいが、本発明において分離対象となる糖脂質はガングリオシドであることが好ましい。本発明の分離方法は、分離対象をガングリオシドとするとき、特に優れた効果を発揮する。「ガングリオシド」は、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であるが、本発明においては、ガングリオシドからシアル酸残基が外れたもの、すなわちアシアロガングリオシドも「ガングリオシド」に含まれるものとする。

以下、各工程について説明する。

工程（a）

工程（a）は、生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出した抽出物に加水分解処理を施して得られる試料溶液を、該試料溶液よりも浸透圧の低い溶液に半透膜を介して接触させる工程である。

「試料溶液」は、生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出して得られる抽出物に、加水分解処理を施して得られるものである。

「生体サンプル」は、動物、植物、微生物などの生体に由来するサンプルであり、分離対象である糖脂質が含有される限り、その種類は特に限定されるものではない。生体サンプルとしては、例えば、動物

若しくは植物の細胞若しくは組織または微生物の菌体が挙げられる。動物、植物または微生物の種類や、細胞または組織の種類は特に限定されるものではない。例えば、スフィンゴ糖脂質は動物界や菌界に分布しており、それらの細胞膜の構成成分となっているので、動物または微生物由来の生体サンプルに含有される。また、グリセロ糖脂質はグラム陽性細菌や高等植物葉緑体に存在しているので、植物または微生物由来の生体サンプルに含有される。

生体サンプルには、糖脂質の他、単純脂質やリン脂質（例えば、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質等）が含まれており、生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出すると、これらの脂質が混合物として抽出される。生体サンプルからの脂質の抽出条件は、非極性溶媒と極性溶媒との混合液を用いて分離対象となる糖脂質を抽出し得る限り特に限定されるものではなく、常法に基づいて行なえばよい。通常は、生体サンプルに含有される総脂質（単純脂質と複合脂質）を出来る限り多く抽出できるように条件設定を行なう。抽出の際には、生体サンプルを予めホモジナイズしておくといよい。

生体サンプルからの脂質の抽出には、非極性溶媒と極性溶媒との混合液が用いられるが、それら抽出溶媒の種類、混合比等は、生体サンプルにおける脂質の存在状態を考慮して決定される。すなわち、脂質は、一般的には、ファンデルワールス力による結合、疎水結合、水素結合、静電結合、共有結合などの結合を介して生体内高分子（例えばタンパク質や他の脂質）と複合体を形成しているので、これらの結合を切断し得るように抽出溶媒の種類、混合比等が決定される。また、非極性溶媒および極性溶媒の種類、混合比等は、その混合物を放置したときに非極性溶媒相と極性溶媒相の二相に分離するように選択される。

非極性溶媒としては、クロロホルム、ピリジン等の非極性有機溶媒またはこれらの2種以上の混合物を用いることができる。また、極性溶媒としては、水、メタノール、酢酸ナトリウム等の極性有機溶媒またはこれらの2種以上の混合物を用いることができる。

これらのうち、非極性溶媒としてクロロホルムおよびピリジンを選択し、極性溶媒として水およびメタノールを選択し、水とメタノールとクロロホルムとピリジンとの混合物を抽出溶媒として用いることが好ましい。

非極性溶媒と極性溶媒との混合比は、通常1 : 1 ~ 10 : 1（容量比）、好ましくは1 : 1 ~ 2 : 1（容量比）である。クロロホルムとメタノールと水とピリジンとの混合物を抽出溶媒として用いる場合、それらの混合比を例えば2 : 1 : 1 : 0.03 ~ 4 : 2 : 1 : 0.03とすることができる。

生体サンプルからの脂質の抽出は、通常常温で行なわれる。また、植物脂質の抽出の際には、ホスホリパーゼやリパーゼ等による脂質の分解を防止するために、アルコールを含む抽出溶媒を用いることが好ましい。

「生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出して得られる抽出物」には、生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出して得られた抽出液の他、これに所望の処理を加えた処理物も含まれる。抽出液に加える処理としては、例えば、ろ過、濃縮、希釈、精製（例えばシリカゲルクロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィーなどによる精製）等が挙げられ、これらの処理は、抽出液中に含有される脂質を分解させない範囲内において行なわれる。また、これらの処理は、加水分解処理を施した後に行なってもよい。

生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出して得られ

る抽出物に対して行なう加水分解処理は、抽出物に含有される脂質のエステル結合（例えばリン脂質のエステル結合、生体内高分子と脂質との複合体のエステル結合）を切断し得るように行なう。加水分解処理は、アルカリまたは酸を用いて常法に従って行なうことができる。加水分解処理は、弱アルカリを用いて行なうことが好ましい。

生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出して得られる抽出物には、加水分解処理を施した後に中和処理を施すことが好ましい。これによって、糖脂質をより高い回収率および精製度（高純度）で分離することが可能となる。中和処理は、アルカリで加水分解したときは酸を用いて行なうことができ、酸で加水分解したときはアルカリを用いて行なうことができ、その際用いるアルカリおよび酸の種類は特に限定されるものではない。

以上のようにして得られる試料溶液には、分離対象となる糖脂質の他、単純脂質やリン脂質などが含まれている。

試料溶液に半透膜を介して接触させる溶液は、試料溶液よりも浸透圧の低い溶液（以下「低張液」という。）であり、その種類は特に限定されない。低張液としては、例えば、水、緩衝液（例えばTE）を用いることができる。

半透膜は、低分子は通すが高分子は通さない膜である。半透膜としては、透析に一般的に用いられる半透膜を用いることができ、その種類は特に限定されない。半透膜としては、例えば、セロファン膜、コロジオン膜、脱硝コロジオン膜、ゲルセロファン膜、パーチメント紙、ポリビニルアルコール膜、天然のぼうこう膜、うきぶくろ膜、人工の硫酸紙、セルロース透析膜等が挙げられ、これらのうち特にセルロース透析膜が好ましい。

試料溶液が半透膜を介して低張液と接触する部分は、試料溶液の全

体であってもよいし、一部であってもよい。また、一部である場合には、試料溶液の何れの部分であってもよい。試料溶液の何れかの部分が半透膜を介して低張液と接触していれば、試料溶液は二層または三層になるが、より多くの部分が半透膜を介して低張液と接触しているほど、試料溶液が二層または三層になるまでの時間を短縮できるので、出来るだけ多くの部分を、半透膜を介して低張液と接触させることが好ましい。

試料溶液を低張液に半透膜を介して接触させる方法は、透析の際に一般的に用いられる方法を用いることができる。例えば、一端をくくった半透膜のチューブに試料溶液を入れ、他端をくくって閉じた後、低張液に浸すという方法を用いることができる。また、液体を収容できる容器を半透膜で仕切って2つの部屋を形成し、それぞれの部屋に試料溶液と低張液とを加えるという方法を用いることもできる。

工程（b）

工程（b）は、工程（a）における接触を、前記試料溶液が二層または三層に分かれるまで継続し、中間層および／または下層を分離する工程である。

試料溶液を低張液に半透膜を介して接触させ、この接触状態を継続すると、試料溶液は二層または三層になる。接触状態を継続する際には、接触させた後に放置しておけばよいが、低張液を攪拌したり、低張液を新しいものに取り換えたりしてもよい。試料溶液が二層または三層になるまでの時間は、試料溶液と低張液との接触面積や低張液の種類などに応じて異なるが、通常は3～6時間程度放置しておけばよい。

試料溶液を低張液に半透膜を介して接触させた状態を継続すると、

低張液から試料溶液に水が混入し、混入した水は試料溶液中の極性溶媒とともに、試料溶液中の非極性溶媒と分離する。すなわち、試料溶液は、非極性溶媒からなる下層と、極性溶媒からなる上層とに分離する。試料溶液にガングリオシドが含有されている場合には、上層と下層との間に、薄状（膜状）の中間層が形成される。このように、試料溶液を低張液に半透膜を介して接触させた状態を継続すると、試料溶液は二層（上層および下層）または三層（上層、中間層および下層）になる。そして、上層には糖脂質以外の成分（例えば、リン脂質、塩など）が分配され、中間層にはガングリオシドが分配され、下層にはガングリオシド以外の糖脂質が分配される。したがって、中間層および／または下層を分離することによって、試料溶液から糖脂質を含有する画分を分離することができる。また、中間層を分離することによって、試料溶液からガングリオシドを含有する画分を分離することができる。

中間層および下層には、試料溶液中のほとんどの糖脂質が含有されているので、中間層および下層を分離することによって、高い回収率で糖脂質を分離することができる。また、中間層には、試料溶液中のほとんどのガングリオシドが含有されているので、中間層を分離することによって、高い回収率でガングリオシドを分離することができる。

また、中間層には、シアル酸残基を有するガングリオシドの他、ガングリオシドからシアル酸残基が外れたアシアログングリオシドも含まれるので、中間層および下層を分離することによって、分離条件を変えことなく、多種類の糖脂質を回収することができる。

また、中間層に含有されるガングリオシド、中間層および／または下層に含有される糖脂質は、高い精製度（純度）であるが、必要に応じて、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高性能薄層クロマトグラフ

ィー（H P T L C）、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）で処理してさらに精製することができる。

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

〔実施例 1〕

以下の方法 1、方法 2 および方法 3 によって、生体サンプルから糖脂質を分離した。なお、方法 1 は本発明に係る糖脂質の分離方法であり、方法 3 は従来法である。

〔方法 1〕

Sandhoff 病モデルマウス（ジャクソンラボラトリー）の脳の半球（200～260mg）を蒸留水 1ml でホモジナイズした後、クロロホルム：メタノール（2：1（容量比））12ml を加え、さらにホモジナイズした。次いで、ピリジン 60 μ l を加え、50℃で 2 日間インキュベートすることにより、総脂質（単純脂質、リン脂質および糖脂質）を含む抽出液を得た。

この抽出液をろ過してタンパク質と残渣を除いた後、50mMの水酸化ナトリウム・メタノール溶液 4ml を加えて加水分解し、リン脂質のエステル結合を加水分解し、次いで 1N の酢酸ナトリウム・メタノール溶液 40 μ l を加えて中和し、試料溶液を得た。

試料溶液をセロファンチューブに収容し、これを蒸留水に浸して放置した。平衡化現象によってセロファンチューブ内に蒸留水が混入し、約 2 時間後に試料溶液は、上層、中間層および下層の三層に分かれた。上層、中間層および下層を分離して、それぞれ乾固させた。

〔方法 2〕

方法 1 で調製した試料溶液に含有される糖脂質を薄層クロマトグラフィーによって分離した。

[方法 3]

Sandhoff 病モデルマウスの脳の半球 (200 ~ 260 mg) をクロロホルム : メタノール (2 : 1 (容量比)) およびクロロホルム : メタノール : 蒸留水 (1 : 2 : 0.8 (容量比)) で抽出し、総脂質 (単純脂質、リン脂質および糖脂質) を含む抽出液を得た。

この抽出液を DEAE-Sephadex カラムに通した後、クロロホルム : メタノール : 0.8N 酢酸ナトリウム (1 : 2 : 0.8) で酸性糖脂質を溶出した。0.1N の水酸化ナトリウム・メタノール溶液で加水分解した後、1N 酢酸で中和し、逆相カラム (SeppackC18) に通して脱塩した。

上記方法 1、方法 2 および方法 3 によって得られた糖脂質をクロロホルム : メタノール (2 : 1 (容量比)) に溶解した後、シリカゲルプレートにクロロホルム : メタノール : 0.25% CaCl_2 (60 : 35 : 8) で展開し、アンスロン硫酸を吹き付けてホットプレートで発色させた。プレート上のバンドは、クロマトスキャナー (Shimadzu CS-930) で定量し、それぞれの方法における糖脂質の回収率、および回収された糖脂質の組成を比較検討した。なお、シアル酸の定量はチオバルビツール法 (Aminiitt, D. (1961) *Biochem J*, 81, 384-392) により行ない、糖脂質の定量はフェノール酸硫酸法 (Dubols, M (1956) *Anal. chem.* 28, 350) により行なった。

薄層クロマトグラフィーの展開結果を図 1 および図 2 に示す。図 1 は、方法 1 で得られた糖脂質の展開結果であり、図 1 中、レーン 1 は上層に含有される糖脂質、レーン 2 は中間層に含有される糖脂質、レーン 3 は下層に含有される糖脂質、レーン 4 は分子量マーカーである。また、図 2 は、方法 1 ~ 3 で得られた糖脂質の展開結果であり、図 2 中、レーン M は分子量マーカー、レーン I は方法 1 で得られた中間層

に含有される糖脂質、レーン I I は方法 2 で得られた糖脂質、レーン I I I は方法 3 で得られた糖脂質である。

図 1 に示すように、上層（レーン 1）には、痕跡量程度の糖脂質以外に脂質は認められなかった。また、中間層（レーン 2）には、コレステロール、セレブロシド (Cereb)、スルファチド (Sulf)、ガングリオシド (GA2, GM2, GM1, GD1a, GD1b, GT1b) が認められた。また、下層（レーン 3）には、コレステロール、セレブロシド (Cereb)、スルファチド (Sulf)、ガングリオシド (GA2, GM2) が認められた。

したがって、中間層および下層に総糖脂質が含有されており、中間層および下層を分離することによって総糖脂質を得ることができることが判明した。また、中間層には、ほとんどのガングリオシドが含有されているので、中間層を分離することによってガングリオシドを得ることができることが判明した。

また、中間層に含有されるガングリオシドには、シアル酸残基を有するガングリオシド (GM2, GM1, GD1a, GD1b, GT1b) の他、ガングリオシドからシアル酸残基が外れたアシアロガングリオシド (GA2 (アシアロ GM1))、グロボシドなどの糖脂質も含まれており、中間層および下層を分離することによって、分離条件を変えることなく、多種類の糖脂質を回収できることが判明した。

図 2 に示すように、方法 1 で得られた中間層に含有される糖脂質の展開結果と、方法 2 で得られた糖脂質の展開結果とはほぼ一致しており、方法 1 によってクロマトグラフィーと同程度の種類の糖脂質を分離・精製できることが判明した。また、方法 1 および方法 2 で回収された糖脂質の量は、方法 1 の方が方法 2 よりも糖で 4.7%、シアル酸で 9.8% 多かったことから、方法 1 がクロマトグラフィーと同程度の回収率で糖脂質を分離・精製できることが判明した。

また、図 2 に示すように、方法 1 で得られた中間層に含有される糖脂質は、方法 3 で得られた糖脂質よりも多種類で、しかも回収率が高く、方法 1 は従来法よりも多種類の糖脂質を高回収率で分離・精製できることが判明した。なお、方法 3 で回収された糖脂質の量が方法 1 および方法 2 の半分以下であったのは、DEAE-Sephadex カラムで中性糖脂質である GA2 が除かれていたためである。

〔実施例 2〕

Sandhoff 病モデルマウスの脳以外の生体サンプルからも、方法 1 によって糖脂質を分離した。

用いた生体サンプルは、脳、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、肺、子宮、精巣および膵臓である。

方法 1 によって得られた糖脂質をクロロホルム：メタノール（2：1（容量比））に溶解した後、シリカゲルプレートにクロロホルム：メタノール：0.25% CaCl_2 （60：35：8）で展開し、アンスロン硫酸を吹き付けてホットプレートで発色させた。プレート上のバンドは、クロマトスキャナー（Shimadzu CS-930）で定量し、糖脂質の回収率、および回収された糖脂質の組成を比較検討した。

その結果を図 3 に示す。

図 3 に示すように、肝臓、脾臓、子宮および脳から各臓器に蓄積している GM2, GA2, GD2 を、腎臓からはグロボシドを精製することができた。また、蓄積せず自然状態で存在する微量のガングリオシドも精製することができた。特筆すべきは、ガングリオ（ganglio）系列以外のグロボ（globo）系列、ラクト（lacto）系列も同時に精製できていることである。糖脂質の基本糖鎖系列には、ガングリオ（ganglio）系列、グロボ（globo）系列、ラクト（lacto）系列、イソグロボ（isog

lobo) 系列、ネオラクト (neolacto) 系列、イソガングリオ (isoganglio) 系列、ラクトガングリオ (lactoganglio) 系列などがあるが、これらの結果から、ガングリオ (ganglio) 系列を含む基本糖鎖系列全てを同じ条件で一括して精製できることが示唆された。

産業上の利用の可能性

本発明により、糖脂質の分離方法が提供される。本発明の糖脂質の分離方法は、簡便かつ低コストに多数のサンプルを処理でき、しかも多種類の糖脂質を回収できるとともにその回収率が高い。このような効果は、分離対象をガングリオシドとしたときに特に大きい。

請 求 の 範 囲

１．以下の工程：

（a）生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出した抽出物に加水分解処理を施して得られる試料溶液を、該試料溶液よりも浸透圧の低い溶液に半透膜を介して接触させる工程

（b）前記接触を、前記試料溶液が二層または三層に分かれるまで継続し、中間層および／または下層を分離する工程を含むことを特徴とする糖脂質の分離方法。

２．前記糖脂質がガングリオシドであって、前記工程（b）において、前記接触を前記試料溶液が三層に分かれるまで継続し、中間層を分離することを特徴とする請求項１記載の分離方法。

３．生体サンプルが、動物若しくは植物の細胞若しくは組織または微生物の菌体であることを特徴とする請求項１または２記載の分離方法。

４．前記非極性溶媒が、クロロホルム、ピリジンまたはこれらの混合物であり、前記極性溶媒が水、メタノール、酢酸ナトリウムまたはこれらの２種以上の混合物であることを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の分離方法。

５．前記非極性溶媒と極性溶媒との混合液が、水とメタノールとクロロホルムとピリジンとの混合物であることを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の分離方法。

６．前記試料溶液が、前記抽出物に加水分解処理を施した後、中和処理を施して得られるものであることを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の分離方法。

要 約 書

簡便かつ低コストに多数のサンプルを処理でき、しかも多種類の糖脂質を回収できるとともにその回収率が高い、糖脂質（特にガングリオシド）の分離方法を提供することを目的とし、本発明の糖脂質の分離方法においては、（a）生体サンプルを非極性溶媒と極性溶媒との混合液で抽出した抽出物に加水分解処理を施して得られる試料溶液を、該試料溶液よりも浸透圧の低い溶液に半透膜を介して接触させた後、（b）前記接触を、前記試料溶液が二層または三層に分かれるまで継続し、中間層および／または下層を分離する。